



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y ACUOSO DE LA HOJA DE *Rosmarinus officinalis* (romero) SOBRE CEPAS DE *Streptococcus betahemolítico del grupo A* COMPARADO CON AMPICILINA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MEDICO CIRUJANO**

AUTOR:

CUBAS REGALADO LESLY MELISSA

ASESOR:

DRA. ANA VILMA PERALTA IPARRAGUIRRE
MG. BLGO. JAIME POLO GAMBOA

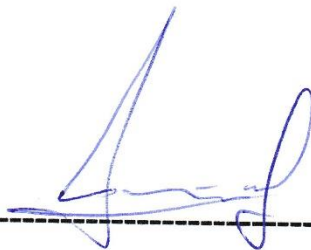
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

Trujillo - Perú

2018

PÁGINA DEL JURADO



MG. Jaime Abelardo POLO GAMBOA

Presidente.



MG. Víctor Darío MORILLOS ARQUEROS

Secretario.



Dra. Ana Vilma PERALTA IPARRAGUIRRE

Vocal.

DEDICATORIA

|A mis padres, hermanas y sobrinos, por ser mi razón de vida y de superación, todos los días.|

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, a la virgen María por las fuerzas que me envían cuando más lo necesito.

Agradezco a la Dra. Ana Vilma Peralta Iparraguirre y al Mg. Blgo. Jaime Polo Gamboa, quien se tomó un tiempo para cada corrección que hizo y que con dicha satisfactoria siento que lo he logrado..

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo [Cubas Regalado Lesly Melissa] con Documento nacional de identidad N° [72625052] a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de [Ciencias Médicas] - Escuela de [Medicina], declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

[Trujillo, noviembre 2018]

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada [“Efecto antibacteriano del extracto etanólico y acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* comparado con ampicilina”], la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de [Médico cirujano].

ÍNDICE

Tabla de contenido

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	5
PRESENTACIÓN	6
ÍNDICE	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Realidad Problemática	1
1.2 Trabajos previos	2
1.3 Teorías relacionadas al tema	4
1.4 Formulación del Problema	8
1.5 Justificación del estudio	8
1.6 Hipótesis	8
1.7 Objetivos	9
II. MÉTODO.....	9
2.1 Diseño de Investigación	9
2.2 Variables, Operacionalización	10
2.3 Población y muestra	11
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	12
2.5 Métodos de análisis de datos.....	12
2.6 Aspectos éticos.....	13
III. RESULTADOS.....	14
IV. DISCUSIÓN.....	18
V. CONCLUSIONES.....	20
VI. RECOMENDACIONES	21
VII. PROPUESTA	¡Error! Marcador no definido.
REFERENCIAS	22
ANEXOS	1

RESUMEN

De acuerdo a las propiedades antimicrobianas descritas en las literaturas del *Rosmarinus officinalis*, cuyo objetivo en el presente estudio fue evidenciar si existe inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus beta hemolítico del grupo a*, mediante el uso de extractos: etanólico y acuoso del romero, utilizando el método de Kirby Bauer modificado. Este estudio se realizó mediante un diseño experimental; se trabajaron 20 placas con las diferentes concentraciones: 25, 50, 75 y 100% de extracto etanólico y acuoso de hojas *Rosmarinus officinalis* y como control de inhibiciones se utilizó el gold estándar según la CLSI de acuerdo al germen: ampicilina.

Se encontró que el máximo diámetro del halo inhibitorio lo alcanzó la concentración del extracto etanólico de la hoja de *Rosmarinus officinalis* al 100% con una media de 35.1 ± 0.6 mm, observándose que este halo disminuye progresivamente hasta la concentración al 25% que obtuvo una media de 22.7 ± 0.9 mm. También se encontró una actividad antibacteriana nula del extracto acuoso frente al *Streptococcus betahemolítico del grupo a*.

Palabras Claves: *Streptococcus beta hemolítico del grupo a*, *Rosmarinus officinalis*, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

According to the antimicrobial properties described in the literature of *Rosmarinus officinalis*, whose objective in the present study was to show if there is inhibition of in vitro bacterial growth of group A beta hemolytic *Streptococcus*, through the use of extracts: ethanolic and aqueous rosemary, using the modified Kirby Bauer method. This study was carried out through an experimental design; 20 plates with different concentrations were worked: 25, 50, 75 and 100% of ethanolic and aqueous extract of leaves *Rosmarinus officinalis* and as control of inhibitions the gold standard was used according to the CLSI according to the germ: ampicillin.

It was found that the maximum diameter of the inhibitory halo was reached by the concentration of the ethanolic extract of the *Rosmarinus officinalis* leaf at 100% with a mean of 35.1 ± 0.6 mm, observing that this halo decreases progressively until the 25% concentration obtained an average of 22.7 ± 0.9 mm. A null antibacterial activity of the aqueous extract against the *betahemolytic Streptococcus of group a* was also found..

Keywords: [Group A betahemolytic *Streptococcus*, *Rosmarinus officinalis*, antibacterial activity.]

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Realidad Problemática

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son enfermedades de origen viral, bacteriano, micótico y parasitario, representan uno de los motivos de consultas más habituales, siendo ésta la principal causa de morbilidad en el orbe. La faringitis es la afección más frecuente de las vías aéreas altas, las bacterias responsables son: el estreptococo (A, C y G), *Mycobacterium pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diptheriae*, *Neisseria meningitidis*, *haemophilus influenzae tipo b*.^{1,2,3}

A nivel mundial, de los quince millones de defunciones anuales de niños menores de cinco años, cerca de cuatro millones al año u once mil al día, son causados por infecciones respiratorias agudas en países en vías de desarrollo siendo de 30 a 70 veces mayor en comparación a los países desarrollados.⁴

A nivel nacional, en el 2013, el Ministerio de Salud (MINSA) determinó que el grupo de morbilidad más frecuente, según el registro de las atenciones, seguido de septicemia, fueron las enfermedades del sistema respiratorio, el cual incluyó a la amigdalitis aguda y faringitis. En La Libertad, el Ministerio de Salud determinó que las infecciones del tracto respiratorio superior fueron la segunda causa de morbilidad durante los años 2011 -2013. Registrándose un total de 1820 atenciones por IRAs, representando el 15.62% del total de pacientes.⁵

Dentro de las políticas de salud, la OMS menciona la importancia de los programas de prevención a través de las intervenciones de salud pública, la corrección de la contaminación, la promoción de prácticas de higiene.¹ En los casos de IRA por *Streptococcus beta hemolítico del grupo a*, existen una serie de antibióticos, siendo los de uso preferencial: las penicilinas y los macrólidos.⁶ De otro lado, el *Rosmarinus Officinalis L.* (romero) es una arbusto conocida en el mundo por su actividad biológica antimicrobiana y cuyo empleo esta diversificado en el orbe especialmente en la población de menores recursos económicos.⁷

1.2 Trabajos previos

1.2.1 INTERNACIONAL

Solano X. (Ecuador, 2016), encontró la existencia de inhibición de crecimiento bacteriano del *Streptococcus mutans*, empleando extracto oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero); mientras que con el uso del extracto acuoso no se reportó inhibición de este microorganismo. Las concentraciones utilizadas fueron 1,5 y 3 % para el extracto acuoso, y para el extracto oleoso, la concentración mínima bactericida (CMB) de 50%, presentado en halos de inhibición para *S. mutans* por el extracto oleoso de *Rosmarinus O.*, frente a los controles de Clorhexidina al 0,12%, una media de 11,93mm, con un máximo de 14mm y mínimo de 10 mm.⁸

Bernardes W., et al (Brasil, 2010), se analizó la actividad del aceite esencial del romero contra microorganismos orales. La actividad antimicrobiana del aceite fue probado contra los siguientes microorganismos: *Streptococcus mitis*, *Strept. mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Strept. sobrinus* y *Enterococcus faecalis*, que son potencialmente responsables de la formación de caries dental en los seres humanos. El método de microdilución se utilizó con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM). El aceite esencial mostró baja actividad contra los microorganismos seleccionados en el estudio. El patógeno *S. mitis* fue el más susceptible con 300 - 2000 ppm (mg/L) y *E. faecalis* fue el más resistente a las muestras evaluadas.⁹

Castaño H. et al (Colombia, 2010), evaluaron la actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial y del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* sobre: *Escheria coli*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus*. El aceite esencial mostró variada actividad contra Gram negativos como Gram positivos con CIM entre 512 – 4096 ppm (mg/L). El extracto etanólico de romero mostró acción antibacteriana contra *S. typhimurium*, *S. sonnei* y *L. monocytogenes* con CIM de 1024 ppm.¹⁰

1.2.2 NACIONAL

Sosa J. (Perú, 2016), estudió la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y el agua ozonizada sobre el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Mediante vía difusión se obtuvo halos de inhibición de 25 mm y 19 mm respectivamente a una concentración de 25mg/ml, mientras que a 50 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición promedio de 36 mm para *E. faecalis* y de 24 mm para *S. mutans*. No existió actividad antibacteriana a concentraciones de 0.41 mg/ml y 0.82mg/ml de agua ozonizada sobre los microorganismos mencionados.¹¹

Tacca J., et al (Perú, 2014), determinaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a *Streptococcus viridans*, *Actinomyces sp* y *Lactobacillus sp*. Se comparó los diámetros de los halos inhibitorios de romero, de Digluconato de clorhexidina al 2% y del agua destilada frente a los microorganismos de estudio. Los diámetros de los halos del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presentaron una media de 9.222 mm \pm 0.9718, el Digluconato de clorhexidina al 2% fue de 15.222 mm \pm 3.4921 y del agua destilada 0 mm. Se puede dilucidar que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, presenta efecto antibacteriano in vitro frente a las tres especies de bacterias estudiadas.¹²

San Román I. (Perú, 2013), analizó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. sobre anaerobios en sujetos con periodontitis. Encontró un promedio similar entre el halo de inhibición de clorhexidina al 0,12% fue 13.43 mm, con el extracto etanólico de romero 75 mg/ml fue 13.35 mm el cual no se traduce en una diferencia estadística. El aumento de la concentración del extracto etanólico de 25 mg/ml a 75 mg/ml, coincide con un mayor halo de inhibición, aunque no superior a la de la clorhexidina al 0,12 %. Con un intervalo de confianza del 95 %, por lo que es conveniente emplearlo en pacientes sujetos con periodontitis por anaerobios.¹³

1.2.3 LOCAL

Gutiérrez M. (Perú, 2013), identificó la acción del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus β-hemolítico*. Se utilizaron a distintas concentraciones (250; 500; 750 y 1000 mg/mL) comparado con penicilina. Para verificar la acción del extracto sobre el germen, se utilizó el método de Kirby Bauer en placas con Agar, la media de los halos de los cultivos del germen con las distintas concentraciones del romero osciló entre 22,3 a 37,3 ±2.5 mm, obteniéndose un diámetro mayor a medida que se aumentó la concentración del extracto en el rango de 250 a 1000 mg/mL, demostrando que el crecimiento del *Streptococcus beta hemolítico* es dependiente de la concentración de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* con una certeza del 95%. ¹⁴

1.3 Teorías relacionadas al tema

El *Streptococcus B hemolítico Grupo A* (SBHGA), también llamada *Streptococcus pyogenes* “formadora de pus”, es una bacteria Gram (+) con una morfología cocobacilar, su hábitat son las vías aéreas superiores y la piel en pacientes sin enfermedad. Son cocos Gram positivos de diámetro entre 1 y 2 mm, en cadenas o pares, anaerobios facultativos, la mayoría de los cuales crece en un ambiente con CO₂, el crecimiento de dicho germen es en el medio de agar sangre enriquecida, pero se inhibe en concentraciones elevadas de glucosa. Luego de un día de incubación se pueden observar colonias blancas de uno a dos milímetros. ¹⁵

Su estructura contiene carbohidratos, proteínas, estreptolisinas y ácido lipoteicoico. El carbohidrato específico de grupo, constituye el 10% del peso seco de la célula (antígeno del grupo A), es un dímero de N-acetilglucosamina y de ramosa, presenta proteína M y F, asociada a estreptococos virulentos. ¹⁵ El extremo amino, sobre la superficie celular, brinda la variedad antigénica de los diferentes serotipos de proteínas M, la cual le da la capacidad de adherirse a las células del organismo anfitrión. Las estreptolisinas lisan hematíes, leucocitos y plaquetas. ¹⁶

La colonización del *S. pyogenes* en la vía respiratoria superior es llega a ser asintomática y en la piel suele ser transitoria. Estos microorganismos llegan a permanecer en superficies secas durante períodos prolongados. Su transmisión es mediante las gotitas de Flugge o a través de lesiones de la piel, luego del contacto directo con una persona, con un artrópodo vector o con un fómite contaminado.^{15, 16}

Los *Streptococcus pyogenes* son responsables de generar: infecciones supurativas como escarlatina, faringitis, pioderma, celulitis, erisipela, fascitis necrosante, síndrome del shock tóxico estreptocócica) y la neumonía; infecciones no supurativas: glomerulonefritis aguda, fiebre reumática.^{15, 16, 17, 18}

El mayor riesgo para padecer las enfermedades producidas por dicho germen son los niños de 2 a 15 años; los pacientes con infecciones extensas de los tejidos blandos y bacteriemias, personas con mala higiene y los ancianos. Aunque el microorganismo está presente en todas partes y en todo momento, la faringitis, fiebre reumática o glomerulonefritis se asocia más durante los meses fríos; y en los meses cálidos es más frecuente la aparición de pioderma y glomerulonefritis.^{17, 18}

Un antibiótico de elección para infecciones por *Streptococcus beta hemolítico Grupo A* es la ampicilina, bactericida para Gram positivas y Gram negativas, meningococo y *Listeria*. Algunos neumococos, *Streptococcus viridans* y *Haemophilus influenzae* no productor de betalactamasas muestran resistencia variable a ampicilina.¹⁹

La ampicilina pertenece al grupo de las aminopenicilinas, poseen actividad antibacteriana. Los enterococos poseen el doble de sensibilidad a la ampicilina, comparado con la penicilina G (la concentración mínima inhibitoria [CIM] de la ampicilina es de 1.5 µg/ml).²⁰

Diversos gérmenes presentaron alta sensibilidad cuando se utilizó por primer vez la ampicilina como las cepas de *Escheria coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, y *Shigella*, actualmente muestra gran porcentaje creciente de resistencia. La administración con un inhibidor de la betalactamasa, como sulbactam o ácido clavulánico, aumenta el espectro de actividad de las aminopenicilinas. La ampicilina

muestra estabilidad en un medio ácido y se absorbe fácilmente por administración oral. La dosis de 0.5 g produce concentraciones en plasma hasta 3 µg/ml a las dos horas. Su absorción no es completa si consume alimentos antes de la ingesta del fármaco.^{19, 20}

Cuando el paciente presenta daño renal se debe ajustar la dosis del mencionado fármaco. Las penicilinas aparecen en la bilis, ingresan a la recirculación enterohepática y la eliminan predominantemente en la defecación. El método preferente consiste en la ingesta oral de 500 mg de ampicilina cada 6 horas, por diez días. Existen reacciones adversas dadas por la ampicilina Las reacciones de hipersensibilidad se manifiestan en cualquiera de las presentación de la penicilina, incluyen erupción urticariana, erupción maculopapular, fiebre, vasculitis, broncoespasmo, dermatitis exfoliativa, síndrome de Stevens-Johnson y anafilaxia.^{20,21}

Se reporta según nueva distribución de discogramas Britania, la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de difusión en discos basados en el método de Kirby-Bauer que nos permiten categorizar al *Streptococcus beta hemolítico* en: sensible ≥ 26 mm, resistente ≤ 18 mm o de sensibilidad intermedia 19–25 mm para la ampicilina.²² Mientras que un reporte más actual sobre halos de inhibición CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) nos muestra que es sensible ≥ 24 mm y resistente ≤ 23 .²³

Un tema importante en el estudio de las amino penicilinas, es la creciente resistencia la cual lleva al fracaso de la actividad antibiótica, generando aumento de la morbimortalidad, así como mayores costos y complicaciones en la estancia hospitalaria, lo que genera la búsqueda de nuevas opciones o alternativas de tratamiento.²⁰

El *Rosmarinus officinalis*, proviene de la familia Lamiaceae y sus nombres vulgares varían en cada país; siendo en el idioma portugués (alecrim, alecrinzeiro), en italiano (erbe delle corone, gusmarino, ramerino), y en castellano (romero, romero común, romeo, rosmarino, aroma de mar). Arbusto con abundantes ramos, color verde, de tallo leñoso, aromático. Ramas nuevas de forma de un cuadrado, corteza grisácea cuando llegan a etapa adulta. Hojas de color verde oscuro, lineal, perenne, de haz brillante y envés blanquecino velludo. Flores de color azul o violeta pálido. Florece en verano y primavera.^{24, 25, 26, 27}

El *Rosmarinus O.* crece en selva, costa y sierra de nuestro país hasta los 3,500 msnm, formando parte del sotobosque, en lugares secos y en laderas de tierras bajas.²⁸

Se usa tradicionalmente para tratar problemas del corazón, evitar la caída del cabello, nervios y neuralgias, enfermedades pulmonares como el asma y la tos. Las flores y hojas de romero son usadas como antiespasmódico, antiinflamatorios, dolores musculares y padecimientos reumáticos. El extracto de romero presenta un efecto hepatoprotector, colerético, colagogo y emenagogo. Se reporta su uso en aplicaciones locales que actúan como cicatrizante, antiséptico y rubefaciente; está contraindicado en la lactancia y el embarazo.^{25, 26, 27, 29, 30}

Se ha descrito que las plantas de romero son fuentes ricas en compuestos fenólicos con alta actividad antimicrobiana tanto contra bacterias Gram (+) como frente a bacterias Gram (-).²⁷

En la composición química del *Rosmarinus officinalis*, se han identificado diversos compuesto encontrados en hojas, flores y tallos, se detallan algunos: aceites esenciales [alcafor (18,9%), alcanfor verbenona (11,3%), α -pineno (9,6%); β -mirceno (8,6%), 1,8-cineol (8,0%) y β -cariofileno (5,1%), limoneno, eucaliptol], ubicados en tallos, flores y hojas; lactonas sesquiterpénicas (carnosol, rosmanol, rosmaridifenol) en hojas; ácidos fenólicos (ácido cafeico, rosmarínico) en hojas; flavonoides (nepitrina, nepetina) en flores, hojas y tallos; taninos y saponinas en flores, frutos y hojas.⁸

Su alto porcentaje de actividad antimicrobiana se le atribuye al ácido carnósico y carnosol. Es evidente que los extractos de romero tienen propiedades bioactivas, pero sus actividades antimicrobianas no han sido profundamente caracterizadas. Los taninos son compuestos amargos que produce la planta, brinda la capacidad astringente del romero. Presenta acción antimicrobiana, estimulando la fagocitosis y la actividad antitumoral mediante la inactivación de adhesinas, enzimas y proteínas de transporte en las bacterias. Los flavonoides tienen relación con la formación de complejos proteicos solubles, extracelulares de la pared bacteriana, que destruyen la misma, en respuesta a la infección microbiana. Los aceites esenciales presentan acción antimicrobiana y antiséptica, cuyas propiedades se encuentran en el alcanfor, alfa pipeno, 1,8 cineol o eucaliptol, verbenona, limoneno, borneol y canfeno. Los diterpenos tienen acción antimicrobiana cuyo mecanismo consisten en lisar la membrana celular de las bacterias, gracias a sus

compuestos lipofílicos, entre ellos: el ácido oleánico y ácido ursólico; alcoholes triterpénicos como alfa y beta-amirina.^{24, 31}

1.4 Formulación del Problema

¿El extracto etanólico y acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* tienen efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* comparado con ampicilina, estudio in vitro?

1.5 Justificación del estudio

El *Streptococcus beta hemolítico* es una bacteria altamente patógena, reportándose una frecuencia cada vez mayor de resistencia al germen por los antibióticos que comúnmente se administran, siendo por ello que se recurre cada vez más a fabricar otros más caros y más tóxicos. Diversos antecedentes ilustran la existencia de aceites esenciales y extracto de plantas con propiedades antisépticas y bactericidas, lo cual constituye un campo poco explorado en nuestro país, territorio que por lo demás es rico en dichos recursos, siendo ello motivo por el cual se pretende realizar el estudio la cual busca conocer si el extracto etanólico y acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* tiene acción sobre el crecimiento de la cepa de *Streptococcus beta hemolítico*, ya que sus resultados nos permitirán dilucidar información y experiencias necesarias para plantear alternativas para la obtención de nuevos agentes antibacterianos sensibles a dicho germen. De comprobarse la actividad antibacteriana del extracto contra el *Streptococcus beta hemolítico*, se obtendrá un producto económico, mejor tolerado y útil para la comunidad, por ser de fácil adquisición y no presentar efectos colaterales en la salud del individuo.

1.6 Hipótesis

H1: El extracto etanólico y acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* tienen efecto antibacteriano comparado con ampicilina sobre cepas de *Streptococcus beta hemolítico del grupo A*, estudio in vitro.

H0: El extracto etanólico y acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* no tienen efecto antibacteriano comparado con ampicilina sobre cepas de *Streptococcus beta hemolítico del grupo A*, estudio in vitro.

1.7 Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el extracto etanólico y acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* comparado con ampicilina, estudio in vitro.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico y acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las diferentes diluciones.
- Establecer el efecto antibacteriano de ampicilina sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A*.
- Comparar el efecto antimicrobiano de ambos productos.

II. MÉTODO

2.1 Diseño de Investigación

Experimental con repeticiones múltiples³²

RG1:	X1	01
RG2:	X2	02
RG3:	X3	03
RG4:	X4	04
RG5:	X5	05

Donde:

RG: grupos de estudio: 05

X1: Extracto etanólico/ acuoso de *Rosmarinus officinalis* al 100%

X2: Extracto etanólico/ acuoso de *Rosmarinus officinalis* al 75%

X3: Extracto etanólico/ acuoso de *Rosmarinus officinalis* al 50%

X4: Extracto etanólico/ acuoso de *Rosmarinus officinalis* al 25%

X5: Tratamiento con ampicilina

2.2 Variables, Operacionalización

VARIABLE

Variable Independiente: Agente antibacteriano.

- a) No farmacológico: Extracto etanólico y extracto acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis*.
- b) Farmacológico: Ampicilina.

Variable Dependiente: Efecto antibacteriano.

OPERACIONALIZACION

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	<p>Término que incluye los compuestos adquiridos de forma natural o biosintética, u obtenidos en el laboratorio.</p> <p>Debe cumplir mínimo tres (03) condiciones: poseer actividad antimicrobiana, ser tolerado por el huésped y desarrollar su función a bajas concentraciones.³²</p>	<p>Será dividida en los siguientes grupos:</p> <p>a) Romero al 100% b) Romero al 75% c) Romero al 50% d) Romero al 25% e) Ampicilina</p> <p>De la misma manera con el extracto acuoso.</p>	<p>a) RG1 b) RG2 c) RG3 d) RG4 e) RG5</p>	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antibacteriano	<p>Es la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano alrededor de un disco de antibiótico en una placa de agar inoculada con el germen.³³</p>	<p>Se utiliza la técnica de Kirby- Bower del disco de difusión en agar considerando el estándar M100S26 del CLSI.²⁹</p>	<p>a) Efectivo \geq 24 mm b) No efectivo \leq 23 mm</p>	Cualitativa nominal

2.3 Población y muestra

POBLACIÓN. Estuvo constituido por el conjunto de cepas de *Streptococcus beta hemolítico del grupo a* cultivadas, bajo condiciones controladas.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Cepas estándar de *Streptococcus beta hemolítico grupo A*.

Criterios de exclusión:

- Cepas contaminadas de *Streptococcus beta hemolítico grupo A*.
- Cepas de *Streptococcus beta hemolítico grupo A* que no pudiera ser restablecidos en medio de cultivo.

MUESTRA:

Tamaño muestral: Por tratarse de un trabajo experimental, se empleó la formula estadística de diferencia de promedios sobre halos de inhibición, para el cálculo del número de placas que validen el diseño experimental.³⁴

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(X_1 - X_2)}$$

Donde:

$Z_{\alpha/2} = 1,96$

$Z_{\beta} = 0,84$

$X_1 = 24$ diámetro del halo de inhibición de la ampicilina²³

$X_2 = 22,3 \pm 2,5$ diámetro del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico del *Rosmarinus Officinalis*.¹⁴

$n = 17,63$ Para el presente estudio, se usó 20 placas.

Unidad de análisis: Cada una de las cepas de *Streptococcus beta hemolítico grupo A*.

Unidad de muestra: cada placa Petri de cultivo.

Muestreo: Censal. |

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

Técnica: Consistió en la observación directa del crecimiento de los microorganismos en la placa de Petri.

Procedimiento: Para obtener el extracto etanólico se utilizó la obtención mediante el método de maceración con etanol y para el extracto acuoso mediante maceración en agua destilada y para la prueba de sensibilidad antimicrobiana el método de disco de difusión (Ver anexo 01).¹⁴

Instrumento: Se utilizó la ficha de recolección de datos donde se registró los diámetros de los halos de inhibición para cada dilución reportando como efectivo si el halo es ≥ 24 mm, y no efectivo si es ≤ 23 mm.²³ (anexo N°02)

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento de recolección de datos fue validado por 3 expertos en el área de Microbiología, quienes evaluarán las variables de estudio y los ítems considerados y determinará si son relevantes al estudio y tienen claridad, actualidad, objetividad, organización, suficiencia, metodología, coherencia, consistencia y oportunidad para su aplicación. Método de experimentación y Microbiología ya están validados.³⁸ (anexo N°02)

2.5 Métodos de análisis de datos

En estadística descriptiva se obtuvo mediante indicadores de tendencia central: promedio, mediana, intervalo de confianza; para observar el comportamiento de los diámetros de los halos se realizó con ayuda del Software SPSS 23.0. En estadística inferencial se evaluó el ANOVA (análisis de varianza) para determinar la posible existencia de algún efecto antibacteriano, luego se desarrolló las pruebas post ANOVA con la de Tukey para determinar el mejor tratamiento.

2.6 Aspectos éticos

El experimento tuvo la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo. En relación a la ética, por ser un trabajo de investigación in vitro, no infringe las normas éticas. Se respetó el principio ético normado en el código de ética del Colegio Médico del Perú y los principios de bioseguridad establecidas en la declaración de Helsinki.^{39,40,41} (Ver anexo 03)

III. RESULTADOS

TABLA N°1. Efecto antibacteriano del extracto etanólico y acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las diferentes diluciones.

Hoja <i>Rosmarinus officinalis</i>	Concentración	N	Halo inhibitorio		cuartil				
			Media	Desv. Est	1	2	3	Mínimo	Máximo
Extracto etanólico	25%	20	22,7	0,92	22	23	23	21	24
	50%	20	27,4	0,82	27	27,5	28	26	29
	75%	20	30,9	0,79	30	31	31,3	30	32
	100%	20	35,1	0,61	35	35	35	34	36
Extracto acuoso	25%	20	0	0	0	0	0	0	0
	50%	20	0	0	0	0	0	0	0
	75%	20	0	0	0	0	0	0	0
	100%	20	0	0	0	0	0	0	0

Se aprecia que el máximo diámetro del halo inhibitorio lo alcanzó la concentración del extracto etanólico de la hoja de *Rosmarinus officinalis* al 100% con una media de 35.1+0.6mm, observándose que este halo disminuye hasta la concentración al 25% que obtuvo una media de 22.7+0.9 mm. En el caso del extracto acuoso de la hoja de la *Rosmarinus officinalis* las distintas concentraciones tuvieron un halo inhibitorio de 0.0 mm. Para la realización de esta tabla se utilizó el anexo 04, y para el mejor entendimiento del cuadro se utilizó el diagrama de cajas y bigotes que se encuentra en el anexo 05.

TABLA N° 2. Efecto antibacteriano de ampicilina sobre cepas de *Streptococcus* *betahemolítico del grupo A*.

Producto	N	halo inhibitorio		IC 95%		Mínimo	Máximo
		Media	Desv. Est	Inferior	Superior		
Ampicilina	20	35.35	0.74	35.00	35.70	34	37

En cuanto a la ampicilina este alcanzó un halo inhibitorio de 35.35 +0.74 mm.

TABLA N°3. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico y acuoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las diferentes diluciones usando el Análisis de Varianza (ANOVA).

Extracto etanólico					Extracto acuoso					
Halo inhibitorio										
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2291.860	4	572.965	933.648	0.000	19993.960	4	4998.490	45010.100	0.000
Dentro de grupos	58.300	95	0.614			10.550	95	0.111		
Total	2350.160	99				20004.510	99			

Tras aplicar el ANOVA o análisis de varianza realizado, ayudó a determinar que existe diferencias de los halos inhibitorios el cual se considera como significativo ($p=0.000$) entre los tratamientos del extracto etanólico de la hoja *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre las cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A*.

Al usar el análisis de varianza realizado se llegó a establecer que el diámetro de los halos inhibitorios es significativo ($p<0.001$) entre los tratamientos del extracto acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre las cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A*.

TABLA N°4. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico y acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las diferentes diluciones usando la prueba post ANOVA de Tukey.

Halo inhibitorio en mm						Halo inhibitorio en mm						
	Producto	N	subconjunto para alfa = 0.05				Producto	N	subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4			1	2		
E.E	25%	20	22.70				E.A	25%	20	0.00		
	50%	20	27.40					50%	20	0.00		
	75%	20	30.90					75%	20	0.00		
	100%	20	35.05					100%	20	0.00		
	Ampicilina	20	35.35				Ampicilina	20	35.35			
	Significancia		1.000	1.000	1.000	0.745	Significancia		1.000	1.000		

Tras aplicar la prueba post ANOVA de Tukey, se aprecia que la concentración al 100% del extracto etanólico (E.A) de la hoja *Rosmarinus officinalis* tiene un efecto similar a la ampicilina $p=0.745$ ($p>0,01$) en el halo inhibitoria, apreciándose que ambos tratamientos son superior a las otras concentraciones con diferencias significativas.

El resultado obtenido al aplicar la prueba post ANOVA de Tukey, se observa que las diversas concentraciones del extracto acuoso (E.A) de la hoja *Rosmarinus officinalis* no tienen efecto inhibitorio marcando diferencia con la ampicilina donde el halo inhibitoria es 35.35mm en promedio.

|

IV. DISCUSIÓN

- Actualmente dentro de la medicina alternativa, se utiliza productos naturales en el tratamiento de diferentes patologías, conociendo sus principios activos y sus beneficios. Dentro de ellas se encuentra el efecto del vegetal *Rosmarinus Offinicialis*, el cual ha sido utilizado para observar el efecto antimicrobiano contra una de las patologías con mayor morbilidad en nuestro país.

- De acuerdo al efecto antibacteriano del extracto etanólico y acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Streptococcus beta hemolítico del grupo A* se evidencia que el máximo diámetro del halo inhibitorio lo alcanzó la concentración del extracto etanólico de la hoja de *Rosmarinus officinalis* al 100% con una media de 35.1+0.6mm, observándose que este halo disminuye progresivamente hasta la concentración al 25% que obtuvo una media de 22.7+0.9 mm. En el caso del extracto acuoso de la hoja de *Rosmarinus officinalis* las distintas concentraciones tuvieron un halo inhibitorio de 0.0 mm. Por lo tanto, solo las concentraciones de 50%, 75% y 100% del extracto etanólico de la hoja de la *Rosmarinus officinalis* tienen un efecto inhibidor. En comparación con el estudio de Solano en el país de Ecuador contrasta con el resultado del extracto acuoso, ya que también se evidencia que no presenta efecto antibacteriano con otras cepas que se utilizaron en dicho estudio.

- En la segunda tabla, efectivamente se comprueba el efecto antibacteriano de ampicilina sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A*, ya que la ampicilina alcanzó un halo inhibitorio de 35.35 +0.74 mm, considerándose como efectivo al superar los 24mm, es importante recalcar que existe el estudio de Gutiérrez en La Libertad, Perú, se evidencia un halo inhibitorio de la penicilina contra el *Streptococcus beta hemolítico del grupo A*, una media de 28,1mm, mayor en comparación con la actividad antimicrobiana de la penicilina.

- Finalmente en la tabla 3 y 4 se logra comparar el efecto antimicrobiano de ambos productos, usando el análisis de varianza realizado el cual se llegó a establecer que el diámetro de los halos inhibitorios es significativo ($p<0.001$) entre los tratamientos del extracto acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre las cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A*.

- Mediante estudios anteriores hemos evidenciado, el efecto antibacteriano del extracto etanólico y oleoso del romero, sin embargo no confirman el efecto acuoso como propiedad antibacteriana. Por ejemplo el estudio de Solano en el país de Ecuador se evidencia que no existe actividad antimicrobiana del extracto acuoso, pero confirman la actividad antimicrobiana del extracto oleoso y se suma estudios como los de Bernardes en Brasil con su aceite esencial del romero, Castaño en Colombia quien también presentan actividad antibacteriana del extracto etanólico y esencial; y en el Perú con los estudios de Sosa y San Roman con extracto etanólico además del estudio de Tacca con el aceite esencial del romero. Y cabe resaltar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico en el estudio de Gutiérrez en el Perú.

- Por lo tanto los resultados del presente estudio afirman que los principios activos del romero tiene efecto antibacteriano frente a *Streptococcus beta hemolítico* debido a los taninos, ya que son sustancias complejas que se presentan como mezcla de polifenoles difíciles de separar. Los taninos llegan a ser tóxicos a levaduras, hongos filamentosos y bacterias. Por lo que se plantean hipótesis para su mecanismo; la inhibición de enzimas de microorganismos, ligándose como sustratos a esas enzimas; a través de su acción sobre la membrana celular, modificando su metabolismo, además de la propiedad de los que taninos que forman capa protectora sobre la mucosa y disminuye el proceso inflamatorio, sin dejar de mencionar dos principios activos importantes para el efecto antimicrobiano que nos brinda el carnosol y el ácido ursólico.

|

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de la hoja *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano contra el *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las concentraciones de 50% 75% y 100%; y el extracto acuoso no presenta efecto inhibidor.
- El efecto antibacteriano de la ampicilina contra el *S. betahemolitico del grupo A* se evidencia por el halo inhibitorio de 35.35 +0.74 mm.
- El extracto etanólico de la hoja *Rosmarinus officinalis* inhibe el crecimiento *Streptococcus betahemolítico del grupo A* con un halo inhibitorio máximo de 35.1 +0.61 y el extracto acuoso no tiene efecto antibacteriano.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar el romero para tratamientos antibacterianos del extracto etanólico en concentraciones de 50, 75 y 100% sobre las cepas de *Streptococcus beta hemolítico del grupo a*.
- Realizar diversos estudios utilizando el romero contra el *Streptococcus pyogenes*.
- No tener un uso indiscriminado de los antibióticos.
- Complementar el trabajo con estudios in vivo.

REFERENCIAS

1. OPS. OMS. Infecciones respiratorias en Perú. Experiencia frente a la temporada de bajas temperaturas. 2014. [Consultado 2017 Abr 09] Disponible en:
<http://www.paho.org/per/images/stories/FtPage/2014/PDF/iras.pdf>
2. Barberan J, Gimenez M, Aguilar L. y Prieto J. Evidencia científica y concepción global del tratamiento empírico e la infección de vías respiratorias bajas en la comunidad. 2004. [Consultado 2017 Abr 09]. Págs. 317-324. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Lorenzo_Aguilar/publication/28078416_Evidencias_cientifica_y_concepcion_global_del_tratamiento_empirico_de_la_infeccion_de_vias_respiratorias_bajas_en_la_comunidad/links/09e4150c996f96320d000000/Evidencias-cientifica-y-concepcion-global-del-tratamiento-empirico-de-la-infeccion-de-vias-respiratorias-bajas-en-la-comunidad.pdf
3. Carmona J. Infección respiratoria aguda en la relación con la contaminación atmosférica y otros factores ambientales. Manizales 2009. [consultado 2017 Abr 09]. Págs. 69- 79. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/2738/273820380009.pdf>
4. OPS. Infecciones respiratorias agudas. Guía para la planificación, ejecución y evaluación de las actividades de control dentro de la atención primaria de salud. Serie PALTEX para ejecutores de programas de salud. 1988 [consultado 2017 Abr 09]. Disponible en:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/173962/1/Infecciones%20respiratorias%20agudas%20Guia%20para%20la%20planificacion,%20ejecucion%20y%20evaluacion%20de%20las%20actividades%20de%20control%20dentro%20de%20la%20atencion%20primaria%20de%20salud.pdf>
5. Ministerio de salud. Estudio Epidemiológico de Distribución y Frecuencia de Atenciones Preventivas y de Morbilidad - Perú 2013. [Consultado 2018 agosto 27]. Disponible en:
http://www.sis.gob.pe/IPRESSPublicas/mIRADORgrep/archivos/20160425_Estudio2013_EstuEpidDistrFrecAtencPrevRecMorbZonaAUS.pdf

6. Actualización en el tratamiento antibiótico de las infecciones respiratorias agudas. INFAC. 2011. [Consultado 2017 Abr 09]. Pags. 19. Disponible en: http://www.osakidetza.euskadi.eus/r85-pkfarm02/es/contenidos/informacion/cevime_infac/eu_miez/adjuntos/INFAC_Vol_19_n_10.pdf
7. Lax V. Estudio de la Variabilidad química, propiedades anti oxidantes y Biocidas de Poblaciones Espontaneas de *Rosmarinus officinalis* L. en la Región de Murcia. (Tesis). Universidad de Murcia; 2014. [Consultado 2017 Abr 09] Disponible en: <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/41969/1/Tesis%20Vanesa%20Lax%20Sin%20publicaciones.pdf>
8. Solano X. Inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *S. mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de Romero aplicando la técnica microbiológica de difusión en Disco. Universidad Central del Ecuador. 2016. [Consultado 2017 Abr 09] Disponible en: www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/5375/1/T-UCE-0015-218.pdf
9. Bernardes W, Lucarini R, Tozatti M, Flauzino L. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Z Naturforsch C*. 2010.. [Consultado 2017 Abr 09]. Págs. 588-93. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138060>
10. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. Bactericidal activity of ethanolic leaf extract and leaf essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Universidad de Antioquia, Colombia. *Rev de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2010. [Consultado 2017 Abr 09] Pags. 149-154. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200006
11. Sosa J. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) y el Agua Ozonizada sobre el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. (Tesis). Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Estomatología. Universidad Señor de Sipán. Pimentel, Perú, 2016. [Consultado 2017 Abr 09] Disponible en: <http://repositorio.uss.edu.pe/xmlui/handle/uss/129>

12. Tacca J, Macedo S, Aquino L. Efecto Antibacteriano in vitro del *Rosmarinus Officinalis* sobre el *Streptococo Viridans*, *Actonomyces* sp. y *Lactobacillus* sp. *Revista Estomatologica del Altiplano*. vol1, N°2 (2014). [Consultado 2017 Abr 12] Disponible en: huajsapata.unap.edu.pe/journal/index.php./REA/article/view/81
13. San Roman I. Actividad Antimicrobiana in vitro del extracto etanolico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivo de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, 2013. [Consultado 2017 Abr 12] Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3093/1/San%20roman_si.pdf
14. Gutiérrez M. Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre la viabilidad de *Streptococcus B-hemolítico* "in vitro". (Tesis). Universidad Nacional de Trujillo. Perú; 2013 [Consultado 2017 Abr 12] Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3465/Gutierrez%20Moreno%2c%20Meliza.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
15. Murray P., Rosenthal K., Microbiología médica. 7ma Ed. Editorial ElSevier. España. 2014. Págs. 231-243.
16. . Bísno A. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 3a. Ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1998.
17. MINSA. Neumonía adquirida en comunidad en adultos mayores. Boletín epidemiológico (Lima) N° 35. Perú; 2012. [Consultado 2017 Abr 17] Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletines/2012/35.pdf>
18. Academia Americana de Pediatría. Comité de Enfermedades Infecciosas. Infecciones Estreptocócicas del Grupo A Invasoras Graves. 1998. [Consultado 2017 Abr 17] Pág. 136 - 40. Disponible en: <http://www.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=Ink&base=MEDLINE&exprSearch=11345977&indexSearch=UI&lang=e>
19. Kasper D. Fauci A. Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e. New York. MacGraw-Hill. 12ma Ed. 1991. Pags. 478-492.

20. Hardman, J.G.; Limbird, L.E. Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 2 volúmenes. 11ª Edición. 2001. Mc Graw Hill Interamericana [Consultado 2017 Abr 17] Disponible en: <https://oncousd.files.wordpress.com/2015/06/goodman-farmacologia.pdf>
21. Mensa J, Gatell J, García S. Guía de Terapéutica Bacteriana. 2013. Barcelona. Editorial Antares.. [Consultado 2017 Abr 29] Disponible en: <http://www.escofetzamora.com/html/cast/catalogo/doc/GUIA-2014.pdf>
22. Britanialab. Nueva distribución de discogramas Britania. Sistema de multidiscos utilizados para pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (antibiogramas). Para uso de diagnóstico in vitro. . [Consultado 2017 Abr 29] Disponible en: http://www.britanialab.com.ar/espanol/k07_01.html
23. Clinical and Laboratory Standards Institut. CLSI. Catalog Supplement. USA. 26th ed. 2016. [Consultado 2017 Abr 29]. Disponible en : http://www2.valtek.cl/cgi-bin/procesa.pl?plantilla=/v2/archivo.html&id_archivo=963&download=1
24. Bernat. Vanaclocha. Fitoterapia. Vademécum de prescripción. 4ta ed. 2003.
25. Pierre J. manual de plantas medicinales del altiplano. Editorial Médicos descalzos. 2013. [Consultado 2017 May 06] Disponible en: <http://www.jardinsdumonde.org/wp-content/uploads/2016/03/MANUAL-DE-PLANTAS-MEDICINALES-GUATEMALA-JDM.pdf>
26. Arango S. guía de plantas de uso común en Salento, Colombia. instituto Humboldt. Pag. 63. [Consultado 2017 May 06] Disponible en: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3570/GuiaMedicinas.pdf>
27. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. MHT. Medicamentos herbarios tradicionales. 103 especies vegetales. PROTEGE. Red de Protección Social. [Consultado 2017 May 07]. Pags.174-176. Disponible en: <http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Libro%20MHT%202010.pdf>
28. Quispe R. "Refugios vegetales para el fomento de la entomofauna benéfica en el agroecosistema del cultivo de maíz en La Molina. Lima, Peru. 2015. [Consultado 2017 May 08]. Disponible en:

- <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1163/T007268.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos. listado de plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos. 2015. [Consultado 2017 May 10]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/images/pdf/salas-especializadas/productos-naturales/2009/Acta102009.htm>
30. Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile. Hierbas medicinales. Chile Pag.49 [Consultado 2017 May 10] Disponible en: http://www.fucoa.cl/publicaciones/hierbas_medicinales/files/assets/mon/downloads/publication.pdf
31. Raúl Avila-Sosa, Addí Rhode Navarro-Cruz, Obdulia Vera-López, Rosa María Dávila-Márquez, Nohemí Melgoza-Palma, Ramón Meza-Pluma. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. [Consultado 2017 May 10] Disponible en: <http://www.umar.mx/revistas/43/0430103.pdf>
32. Paredes F., Roca J., Acción de los antibióticos. Rev. OFFARM VOL 23 NÚM 3 MARZO 2004. [Consultado 2017 May 10] Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414-S300>
33. Melloni B., Dox I. Gilbert M Diccionario médico ilustrado de Melloni. Reverte, 1982. [consultado 2017 May 10]. Disponible en: <http://www.doctissimo.com/es/salud/diccionario-medico/antibacteriano>
34. Dawson Beth. Rober G. Trapp Robert G. Bioestadística médica. Manual moderno. 3era edición. 2002.
35. Universidad de las Américas Puebla. Materiales y métodos de laboratorio. México. 2000. [consultado 2017 May 10]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/barranco_l_sl/capitulo_6.pdf
36. Ruiz M., Efecto inhibitorio in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y *Argemone mexicana* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido. Trujillo, Perú. 2016. [Consultado 2017 May 20]. Disponible en : <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/2564/TESIS%20MAE>

[STR%C3%8DA%20MIGUEL%20ANGEL%20RUIZ%20BARRUETO.pdf?sequence=1](#)

37. Sistema de Gestión de la Calidad del PRONAHEBAS. Manual de Bioseguridad. Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre, 2004. NORMA TÉCNICA N° 015 - MINSA / DGSP - V.01. 2004. Perú. [Consultado 2017 May 20] Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/manual%20de%20bioseguridad.pdf>
38. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. 2013. [Consultado 2017 May 20]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
39. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]. CMP; 2007.
40. Mazzanti M. Declaración de Helsinki. Revista colombiana de bioética [Seriada en Línea] 2011 [Consultado 2017 Jun 10] 6(1): 124-144. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=189219032009>
41. Favi M., Jimenez M., Martínez C., Olivares B., Scappaticcio A., Ramírez V. Guía de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos. Instituto de Salud Pública de Chile 2013 [Consultado 2017 Jun 10]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Manual%20Bioseguridad%20ISPCH.pdf>.
42. Ministerio de economía y finanzas. Sistema de gestión presupuestal. Perú. 2011. [Consultado 2017 Jun 18] Disponible en: https://www.mef.gob.pe/contenidos/presu_publico/clasi_pres/2012/ANEXO2_CLASIFICADOR_DE_GASTOS.pdf
43. Murphy M. Plant products as Antimicrobial Agents Clinical. Microbiology Reviews. 1999; 12(4): 564-582.
44. Bonner J y Galston A. Principios de Fisiología vegetal. 5ª ed. Madrid: Editorial Aguilar; 1993: 304-305

ANEXOS

Anexo 1: Procedimiento.

Anexo 2: Instrumentos de recolección de datos.

Anexo 3: Declaración de Helsinki.

Anexo 4: Cuadro comparativo del efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico, y la ampicilina.

Anexo 5: Diagrama de Caja y Bigotes.

ANEXO 01

METODO DE MACERACION: PROCEDIMIENTO

Recolección de la planta

Se recolectaron hojas y flores de *R. officinalis* L., proveniente de la Provincia de Otuzco (Lat. -7.83333, Long. -78.5833). Se obtiene una muestra completa de las hojas, tallos y raíces de *Rosmarinus Officinalis* para estudiar algún principio activo contenido en ellas.

Se dejan secar al aire hasta peso constante, y se separan hojas, tallos y flores. Si es necesario, la cantidad a utilizar de las hojas es de 1 kg, luego se trituran con un molinillo, aunque la molienda se puede llevar simplemente a mano, en pequeños trozos.

Identificación y determinación taxonómica de la especie.

Cuando lo que se va a analizar es materia vegetal con destino farmacológico, el control de calidad es muy importante en el muestreo, es por ello que será evaluado por el Ingeniero Botánico William Juan Esquivel Reyna para su determinación taxonómica.

Preparación de la muestra

Selección de la muestra: El material vegetal recolectado será transportado al laboratorio de Ciencias médicas de la Facultad de Medicina humana de la Universidad Cesar Vallejo de Trujillo, donde se eliminarán las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.

Lavado del vegetal: Luego se procederá a lavar el material vegetal con agua destilada seguido de una desinfección, utilizando hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se realizará un enjuague de la planta con suficiente agua destilada estéril, esto es para retirar los residuos de hipoclorito.

Secado: Una vez lavadas las hojas, se procederá a adecuar el vegetal en papeles Kraft, y se secará en una estufa a 40°C.

Pulverización: Una vez secadas las hojas se pulverizarán con ayuda de un mortero.

Tamizaje: El material obtenido de la pulverización se tamizará con un set de tamices.

Almacenamiento: El polvo de las hojas obtenidas se guardará en un frasco de vidrio de color ámbar de boca ancha.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus officinalis*

A partir del polvo obtenido se pesaron 50 g y se colocó en un frasco de vidrio de capacidad de 1000 mL cubierto con papel aluminio para proteger el preparado de luz, luego se le agregó el solvente extractor que consistió en etanol absoluto y se procedió a la obtención del extracto etanólico mediante el método de maceración en agitación constante durante siete días.

Después de los siete días de maceración el producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatman N° 41, y posteriormente con papel filtro Whatman N° 2 y N° 1 con lo que se obtuvo el extracto filtrado. Dicho extracto se llevó a Rotavapor, obteniéndose el extracto alcohólico considerado al 100%.

Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *R. officinalis* “romero”. A partir del extracto seco de *R. officinalis*, se realizaron diluciones en etanol obteniéndose concentraciones de 25%; 50%; 75% y 100%. Cada concentración fue colocada en un vial estéril y tapado herméticamente y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su utilización.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus officinalis*

Para la extracción, las plantas son generalmente maceradas en agua destilada posteriormente se filtran. Luego se muelen y maceran 1kg durante 24 horas a 5°, después se filtró (papel filtro nº4) y centrifugo a 13000 rpm/5 min, posteriormente se volvió a filtrar en acrodiscos estériles con poro de 45µm.

OBTENCIÓN DE CEPAS:

Las cepas de *Streptococcus beta hemolítico del grupo a*, serán obtenidas del cepario del Laboratorio de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo

PREPARACIÓN DE LAS CEPAS:

Una vez obtenidas las cepas se cultivarán en tubos de ensayo con tapa rosca conteniendo Agar Tripticasa de Soya (TSA), el cual se incubará a 34°C para obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas se tomará una muestra con el asa Digraiski y se preparará una suspensión en solución salina estéril a partir de las colonias jóvenes. La turbidez de la suspensión se ajustará a la turbidez del estándar 0.5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml), esta comparación se llevará a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuente de luz adecuada.

Los tubos conteniendo la bacteria en estudio serán girados entre las manos durante 30 segundos antes de proceder al sembrado. Se utilizará esta suspensión para inocular las placas que contendrán 15 ml de Agar Mueller-Hinton realizando su sembrado.

Un hisopo estéril será embebido en el tubo de cada cepa y a una distancia de 10cm de la llama del mechero se hará el sembrado en las placas Petri conteniendo el Agar Mueller-Hinton; Se realizará un hisopado uniforme sobre todas las superficies del Agar y se girará cada placa 30 ° por 10 veces aproximadamente. Se utilizará una torunda por cada placa Petri. Las placas recién sembradas se colocarán dentro de una estufa a 37°C de temperatura durante 24 horas.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO:

La prueba de sensibilidad antibiótica se determinó a los 10 cultivos de *Streptococcus b hemolítico* utilizando como control positivo de inhibición: ampicilina.

La evaluación se realizó mediante el método de difusión de Kirb Bauer modificado. Se sembró el inóculo de *Streptococcus beta* hemolítico en placas con Agar Mueller Hinton Modificado por siembra en superficie. Se secaron las placas a estufa por 10 minutos aproximadamente posteriormente se hizo en un pocillo de 6 mm de diámetro en cada placa y se agregaron 0.2 ml de las concentraciones indicadas (100%, 75%, 50% y 25% del extracto etanólico y acuoso previamente preparado además del grupo control, luego las placas se incubaron a 37° C por 24 horas y se realizó la lectura. El ensayo se realizó por triplicado por cada cultivo. Se medirá los halos de inhibición (susceptibilidad) de cada concentración incluyendo el área del disco del papel de filtro con una regla multimetrada.

EL PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN:

Una vez obtenidos los cultivos de cepas estándar, donde se aplicará el extracto acuoso y etanólico de *Rosmarinus officinalis*, los resultados obtenidos serán anotados en el instrumento de recolección de datos.

MANEJO Y ELIMINACIÓN DEL MATERIAL CONTAMINADO Y DESECHOS.

Fundamento: La gestión de residuos debe ser considerada como una parte muy importante de la bioseguridad. La mejor manera de racionalizar los residuos es mediante una gestión integrada cuyos pilares básicos son la minimización, la segregación y la eliminación controlada (disposición).

Las formas más frecuentes de tratamiento de los residuos sólidos son la incineración y la esterilización por autoclave.

Por lo que respecta a la incineración realizada en los propios hospitales, es una actividad cada vez más restringida, debido a la contaminación que origina en las zonas urbanas donde están implantados.

Más frecuente es transferir los residuos a empresas autorizadas, lo que debe hacerse en recipientes rígidos que deberán ser transportados de forma regulada

Manejo en el lugar de generación

1. Los desechos deben ser colocados directamente en bolsas especiales en el momento de su generación, por lo tanto éstas tienen que estar ubicadas en el lugar donde se brinda la atención.

2. Las bolsas tendrán las siguientes especificaciones:

- De material impermeable.
- Espesor de 60 a 80 micras.
- Color rojo.
- Opacas.
- Con el símbolo internacional de residuos biopeligrosos.
- Capacidad máxima de 8 a 10 kilos.
- Con aditamento para sellarse o amarrarse fácilmente.
- De polipropileno de alta densidad, si van a ser sometidas a autoclave.
- De polietileno si no van al autoclave.
- Rotuladas o etiquetadas con el nombre del servicio donde van a ser usadas.
- De diferentes tamaños según el uso.

La bolsa debe ser colocada dentro de un recipiente, cubriendo completamente el borde del mismo, con un dobléz de por lo menos 10 cms de longitud.

1. El recipiente debe tener las siguientes características:

- De diferentes tamaños, según el uso.
- De superficie lisa, redondeada por dentro.
- Con una capacidad máxima de 100 litros para residuos secos y de 50 litros para húmedos.
- Con tapa segura, bien adaptada.


2. La bolsa no debe ser llenada en toda su capacidad, sino hasta 2/3, o en el límite señalado por el fabricante.
3. Las bolsas se llenarán, amarrarán, y serán depositadas en otro recipiente, con las mismas características señaladas en el punto anterior y de mayor tamaño. Con un manubrio que facilite su desplazamiento, con rodines, estable (con el mínimo riesgo de vuelco) y silencioso.
4. Este depósito debe ser identificado con el nombre de los residuos que contiene, ubicado en el cuarto área séptica del servicio de atención.
5. Debe tener impreso el símbolo internacional de desechos biopeligrosos y permanecer tapado.
6. Debe ser retirado, de preferencia dos veces al día, o al menos diariamente si lo anterior no es posible.
7. Cuando los residuos infecciosos son líquidos deben depositarse en recipientes rígidos con tapa hermética antes de ser depositados en la bolsa.


ANEXO 02

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)										
Nº	Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i>				Extracto acuoso de <i>Rosmarinus officinalis</i>				Ampicilina	DMSO
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%		
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										


 Jaime A. Polo Gamboa
 MICROBIOLOGÍA
 CBP 6001


 CBP 13789
 MIGUEL ALVA SEVILLA


 María S. Ayala Ravelo
 Doctora en Salud Pública
 Docente Facultad Medicina
 U.N.T

Anexo 03

Declaración de Helsinki: El estudio tendrá la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, para el uso del laboratorio. Con respecto a la ética, por realizarse el trabajo de investigación in vitro, no hay incumplimiento de normas éticas. Sin embargo en el presente trabajo se respetará el principio ético adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú titulado: “Del trabajo de investigación”, específicamente el 6 Art. 48°, donde habla de la veracidad en la publicación de los resultados obtenidos en el estudio. Así mismo, se tendrán en cuenta los principios de bioseguridad correspondiente a trabajos in vitro, en concordancia con las recomendaciones establecidas en la declaración de Helsinki, adoptada por la 18° Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y modificada por la Asamblea Médica Mundial en Tokio, enero 2004

Anexo 04

Comparación del efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la hoja *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las diferentes diluciones según la consideración de la matriz operacional, según SCLI.

			Efectivo ≥ 24		No efectivo ≤ 23	
		Diluciones	N	%	N	%
EXTRACTO	Etanólico	25%	4	5	16	95
		50%	20	100	0	0
		75%	20	100	0	0
		100%	20	100	0	0
	Acuoso	25%	0	0	0	0
		50%	0	0	0	0
		75%	0	0	0	0
		100%	0	0	0	0

Se observa que los porcentajes de las diversas concentraciones del extracto acuoso de la hoja *Rosmarinus officinalis* no tienen efecto inhibitorio en comparación con el extracto etanólico, el cual se evidencia efecto a partir de la dilución al 50%, basado y utilizando los valores estándar de la SCLI.

Anexo 05

Diagrama de Caja y Bigotes del efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la hoja *Rosmarinus officinalis* y la ampicilina sobre cepas de *Streptococcus betahemolítico del grupo A* en las diferentes diluciones.

